

# Reducción de selenito a Selenio elemental por *Pantoea agglomerans*

## Reduction of selenite to elemental Selenium by *Pantoea agglomerans*

CARLA DAZA<sup>1</sup>, VÍCTOR L. CAMPOS<sup>1</sup>, CLAUDIO ROJAS<sup>2</sup>, SADDYS RODRÍGUEZ-LLAMAZARES<sup>2</sup>, CARLOS T. SMITH<sup>3</sup> & MARÍA A. MONDACA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Ambiental, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Polímeros Avanzados (CIPA), Edificio Laboratorio CIPA, Av. Collao 1202, Concepción, Chile.

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

\*Autor para correspondencia: María Angélica Mondaca. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. Teléfono: 56 (41) 2207478. E-mail: mmondaca@udec.cl

### RESUMEN

El selenio es esencial y requerido por distintos sistemas biológicos para su crecimiento y metabolismo. Su transformación en el ambiente ocurre principalmente por microorganismos que reducen el selenito a selenio elemental. *Pantoea agglomerans* UC-32 reduce el selenito a nanopartículas de selenio elemental. El objetivo de este trabajo fue determinar la cinética de reducción de selenito a selenio elemental y la ubicación celular de la actividad reductora en *Pantoea agglomerans* UC-32. Se ensayó la actividad reductora de *P. agglomerans* frente a diferentes concentraciones de selenito, evaluándose la disminución de selenito y aparición de selenio elemental. La ubicación de la actividad reductora fue estudiada por fraccionamiento celular y zimograma. Al ensayar la actividad reductora de selenito se encontró que la enzima se satura a concentraciones bajas de este compuesto y el zimograma localizó esta actividad en la fracción citoplasmática y que requiere NADPH como coenzima. En conclusión, *P. agglomerans* es capaz de reducir selenito a selenio elemental insoluble inmovilizado en la biomasa en condiciones aeróbicas y que la enzima que cataliza esta reducción se localiza en la fracción de citoplasmática. Estas características permitirían la “síntesis verde” de nanopartículas de selenio las cuales tienen aplicación en la biorremediación de diferentes matrices, como suelo o agua contaminadas.

**PALABRAS CLAVE:** Reducción de selenito, *Pantoea agglomerans*, nanopartículas de selenio.

### ABSTRACT

Selenium is required and essential for the growth and metabolism of several biological systems. Its transformation in the environment occurs mainly by the activity of microorganisms, able to reduce selenite into elemental Selenium. *Pantoea agglomerans* UC-32 reduces selenite to nanoparticles of elemental Selenium. The aims of this work were to determine the kinetics of selenite reduction and to determine the cellular localization of this activity in *P. agglomerans* UC-32. The selenite reducing activity of *P. agglomerans* UC-32 was assayed in the presence of different selenite concentrations and the decrease of selenite and appearance of elemental Selenium were evaluated. The location of this activity was studied by cellular fractioning and zymography. Results indicated that the selenite reducing enzyme saturates at low concentrations of this compound and the zymogram localized this activity in the cytoplasmic fraction and showed that NADPH is required as coenzyme. In conclusion, *P. agglomerans* reduces, under aerobic conditions, selenite into insoluble elemental Selenium, immobilized in the biomass and that the enzyme catalyzing this reduction is cytoplasmatic. These characteristics would allow the “green synthesis” of selenium nanoparticles which have application in the bioremediation of different contaminated matrices, such as soil or water.

**KEYWORDS:** selenite reduction, *Pantoea agglomerans*, selenium nanoparticles.

---

### INTRODUCCION

El selenio es un elemento esencial para la vida y existe en el ambiente en diferentes formas, entre ellas se encuentran el selenito, el seleniato, el selenio elemental (Se<sup>0</sup>) y seleniuro.

El Se se utiliza comúnmente en la industria del vidrio y en electrónica debido a sus propiedades fotoeléctricas y semiconductoras. Además forma parte del sitio activo de selenoproteínas las que tienen funciones biológicas esenciales en humanos, animales y bacterias (Sun *et al.* 2014).

El selenio elemental es menos tóxico debido a que es insoluble y su biodisponibilidad es baja. El Se se puede obtener a escala nanométrica por reducción química o biológica. Dentro de todos los sistemas biológicos, las bacterias son bien conocidas por producir nanopartículas metálicas de diferente composición, tamaño y morfología, este tipo de reducción tiene ventajas con respecto al proceso y a las propiedades que presenta el producto obtenido. Se ha reportado que el selenio elemental como nanopartícula presenta actividad biológica y buena capacidad de adsorción debido a su interacción con grupos funcionales presentes en las proteínas (Torres *et al.* 2012). También se ha visto que las nanopartículas de Se<sup>0</sup> tienen la capacidad de aumentar la eficiencia de enzimas con actividad antioxidante (Gao *et al.* 2002). Reportes indican que esta actividad biológica es comparable a la que muestran el selenito, el seleniato o bien algunas formas orgánicas de selenio (selenometionina, selenocisteína, etc.) (Kojouri *et al.* 2012, Sadeghian *et al.* 2012) por lo que son una alternativa para reemplazar a cualquiera de estas especies actualmente utilizadas como suplementos de selenio en distintos países.

El mecanismo de reducción del selenito se ha estudiado desde distintos puntos de vista. Entre ellos se encuentra que el selenito es altamente reactivo con grupos sulfhidrilo, por lo que se cree que el glutatión podría reducir de selenito a Se<sup>0</sup> vía la reacción de Painter (Hunter *et al.* 2009, Li *et al.* 2014). También se han propuesto sistemas enzimáticos catalizando la reducción. En el caso de microorganismos que realizan respiración anaerobia por ejemplo *Thauera selenatis* la reacción sería catalizada por una enzima reductora de nitrito ubicada en el periplasma, reportándose que mutantes carentes de esta enzima son incapaces de reducir nitrito o selenito (Kessi 2006). En microorganismos aerobios tampoco se conoce con certeza como ocurre la reducción de selenito a Se<sup>0</sup>, sin embargo se han sugerido al menos tres vías diferentes pero no se ha identificado algún gen o enzima exclusivamente responsable de la reducción de selenito (Zheng *et al.* 2014).

La cepa UC-32 de *P. agglomerans* (Torres *et al.* 2012) produce nanopartículas de Se<sup>0</sup> que poseen actividad biológica, sin embargo no se ha descrito como consigue reducir los oxianiones de selenio. El objetivo de este trabajo fue estudiar la reducción de selenito y determinar la ubicación celular de la actividad reductasa en cultivos de *P. agglomerans*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó la cepa *P. agglomerans* UC-32, aislada desde sedimento del río Camarones, desierto de Atacama, Chile,

(Torres *et al.* 2012). La cepa se cultivó en caldo tripticasa (C.T.) a 30°C con agitación (100 rpm) durante la noche. Se agregó un inóculo de este cultivo a un matraz erlenmeyer con C.T. (50 mL) y se incubó durante 10 h a 30°C con agitación. Se adicionó selenito 1 mM (concentración final) y se incubó durante 12h a 30°C con agitación

### REDUCCIÓN DE SELENITO POR *P. AGGLOMERANS*

La reducción de selenito se determinó cualitativamente por la aparición de un precipitado de color rojo correspondiente a Se<sup>0</sup> (Dwivedi *et al.* 2013) {Dwivedi, 2013 #309; Dwivedi, 2013 #309}. *P. agglomerans* se cultivó en presencia de selenito (1 mM) a 30 °C con agitación (100 rpm) y como control se utilizó el medio de cultivo con selenito (1 mM). Además, la cepa bacteriana se incubó en presencia de diferentes concentraciones de selenito (0,25 mM, 0,5 mM y 1 mM) por 48 h a 30°C. Se tomaron muestras cada 12 h y se cuantificó el selenito presente (Dhanjal *et al.* 2010).

### DETERMINACIÓN DE SELENITO Y Se<sup>0</sup>

La cuantificación de selenito se realizó utilizando el método descrito por Cheng (1956) y modificado por Jiang (1994). El método se basa en la formación de un complejo coloreado producto de la reacción de selenito con 3,3-diaminobenzidina. Este complejo se determinó por espectrofotometría (Epoch™ Biotek) a 420 nm (por triplicado). Los datos fueron interpolados en una curva de calibración obtenida a partir de concentraciones estándar de selenito utilizando el software GraphPad Prism 5.

La determinación de Se<sup>0</sup> se realizó utilizando el método descrito por Biswas *et al.* (2011) con modificaciones. Se prepararon soluciones estándar de Se<sup>0</sup> reduciendo el selenito con hidroxilamina. Un cultivo de *P. agglomerans* se incubó con selenito (1 mM) y se tomaron muestras en el tiempo (0, 6, 12, 24 y 48 h). Las muestras fueron centrifugadas a 10.000 x g por 10 min y el pellet bacteriano se lavó con NaCl 1 M, se dejó secar y se incubó con Na<sub>2</sub>S 1 M por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas y se recolectó el sobrenadante para determinar el Se<sup>0</sup> disuelto. Se midió la absorbancia a 500 nm (por triplicado) y se graficó utilizando el software GraphPad Prism 5.

### LOCALIZACIÓN DE ENZIMAS REDUCTORAS DE SELENITO

Se centrifugaron 50 mL de cultivo de *P. agglomerans* a 10.000 x g por 10 min. Las células recolectadas se lavaron 3 veces con NaCl 0,9% y se suspendieron en 50 mL de la misma solución. Un volumen equivalente de sobrenadante se filtró usando filtros de nitrocelulosa de 0.22 µm y tanto el pellet suspendido como el sobrenadante fueron incubados con Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 1mM (Turagova *et al.* 2014). Como control se utilizó el medio de cultivo y el cultivo inoculado sin centrifugar. Las muestras fueron incubadas a 30°C con agitación (100 rpm) por 48 h.

#### FRACCIONAMIENTO CELULAR

Las proteínas del citosol, membrana citoplasmática (MC) y membrana externa fueron obtenidas usando el método descrito por Thein *et al.* (2010) con modificaciones. El cultivo bacteriano se incubó en presencia de selenito (1 mM) a 30 °C con agitación (100 rpm). Después de 12 h se recolectaron 300 mL de cultivo y se centrifugó a 10.000 x g por 15 min. El sobrenadante se descartó y el pellet de células se suspendió en 3 mL de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 8, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, NaCl 150 mmol L<sup>-1</sup>) adicionado con PMFS 1 mmol L<sup>-1</sup> y Lisozima 2 mg mL<sup>-1</sup>. La suspensión se sonicó realizando 6 ciclos de 20-25 s, al 40% de amplitud (Branson/450, BRANSON Ultrasonics Corporation). El lisado se centrifugó a 13.000 x g y el sobrenadante correspondiente a las proteínas de citosol se guardó a -20 °C hasta su uso. El pellet se suspendió en tampón MgCl<sub>2</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup> y Tritón X-100 al 1%. La suspensión se centrifugó a 15.000 x g por 90 min a 4 °C. El sobrenadante correspondiente a las proteínas de membrana citoplasmática y el pellet correspondiente a las proteínas de membrana externa se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### ELECTROFORESIS EN GEL TRICINA SDS-PAGE

Los geles de Tricina-SDS-PAGE se prepararon de acuerdo a lo descrito por Schägger (2006). La concentración de proteínas se midió de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). Las muestras con el tampón de carga en relación 3:1, se calentaron por 5 min en baño térmico (95-99 °C). En cada carril se cargaron 18 µL de cada muestra y se aplicó una potencia de 80 V durante 3 h en una cámara de electroforesis (Mini sistema para Electroforesis EV3).

#### ELECTROFORESIS EN GEL NATIVO Y ZIMOGRAMA

Las proteínas fueron separadas en condiciones nativas de acuerdo a lo descrito por Hunter (2014). Luego de la electroforesis los geles se incubaron con tampones de reacción en donde se evaluó la actividad oxidoreductasa total (ensayo diaforasa) y la reducción de selenito (ensayo metil viológeno). El ensayo diaforasa se realizó incubando el gel nativo NBT 0,5 mg/mL y NADPH 0,2 mM (Sigma-Aldrich N1630). La actividad oxidoreductasa se visualizó por la aparición de bandas de color violeta en el gel. El ensayo metil viológeno se realizó incubando el gel nativo con una solución de metil viológeno 0,6 mM (Pestanal®, Sigma-Aldrich 36541) reducido con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, luego se adicionó selenito 1 mM. De acuerdo a lo descrito por Avazeri *et al.* (1997) la actividad enzimática se visualizó por la aparición de una banda clara en el gel impregnado con metil viológeno reducido (color azul). Además se utilizó una tinción de azul de Coomassie como control de la presencia de bandas de proteínas en los carriles donde hubo reacción positiva.

## RESULTADOS

Al incubar *P. agglomerans* en presencia de selenito 1 mM apareció un precipitado rojo después de 24 h de incubación, este precipitado correspondió a selenio elemental, en el control libre de células no se observó color rojo (Fig. 1).

La reducción de selenito se estudió variando la concentración en el rango de 0,25 mM y 1 mM. En la Figura 2 se muestra la reducción de selenito por *P. agglomerans*. La concentración de selenito en el medio disminuyó luego de 12 h de incubación lo que continuó hasta después de 48 h.

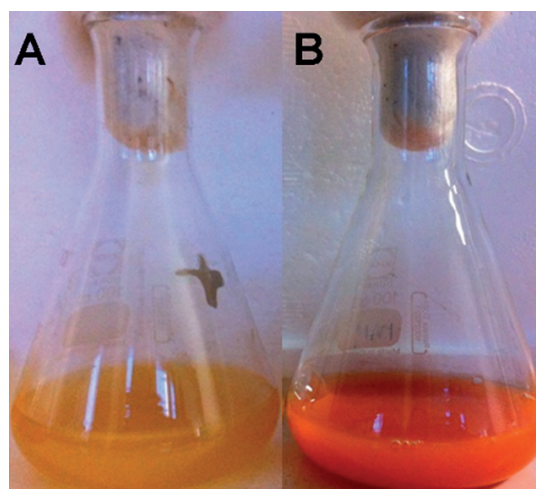


FIGURA 1. Cultivo de *P. agglomerans* UC-32 incubada sin selenito (A) y con selenito 1 mM (B) después de 24 h.

FIGURE 1. Twenty four h culture of *P. agglomerans* UC-32 incubated in the absence of selenite (A) or in the presence of 1 mM selenite (B).

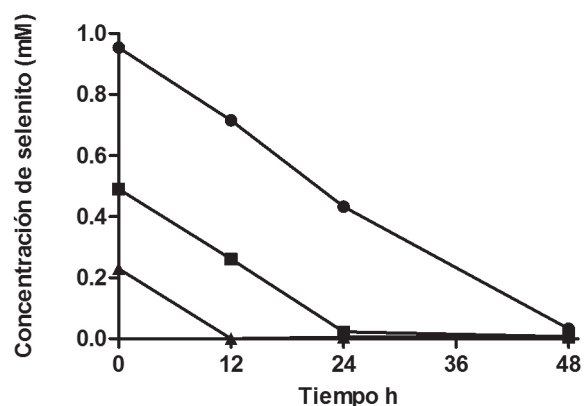


FIGURA 2. Reducción de selenito por *P. agglomerans* incubada en presencia de diferentes concentraciones de selenito: 0,25 mM (▲), 0,5 mM (■) y 1 mM (●). El selenito se agregó a tiempo cero.

FIGURE 2. Selenite reduction by *P. agglomerans* incubated in the presence of different selenite concentrations: 0,25 mM (▲), 0,5 mM (■) and 1 mM (●). Selenite was added at time zero.

La velocidad de reducción de selenito fue modelada usando la cinética de Monod y los resultados obtenidos fueron  $3,73 \pm 0,04 \mu\text{Mol min}^{-1}$ ;  $3,8 \pm 0,09 \mu\text{Mol min}^{-1}$  y  $3,9 \pm 0,1 \mu\text{Mol min}^{-1}$  para las concentraciones de 0,25 mM, 0,5 mM y 1 mM, respectivamente.

En la Tabla 1 se resume el progreso de la reducción de selenito y la formación de selenio elemental. El rendimiento de la reducción de selenito fue de aproximadamente un 73%. Las proteínas de diferentes fracciones subcelulares: citosol y membranas fueron separadas para localizar la actividad enzimática responsable de la reducción de selenito a nivel subcelular.

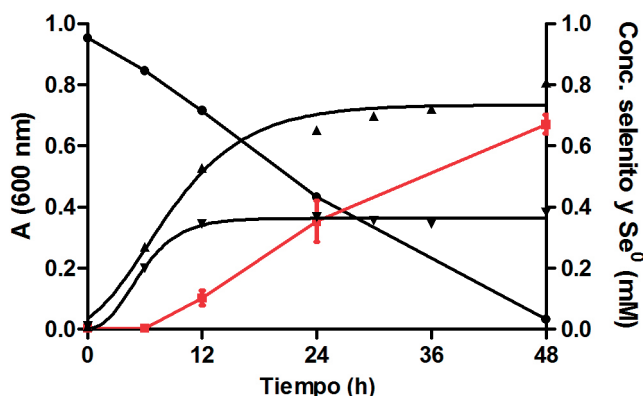


FIGURA 3. Cinética de reducción de selenito (●) a  $\text{Se}^0$  (■) y crecimiento bacteriano de *P. agglomerans* cultivada sin selenito (▲) y con selenito 1 mM (▼).

FIGURE 3. Kinetics of selenite reduction (●) into  $\text{Se}^0$  (■) and *P. agglomerans* growth in the absence of selenite (▲) and in the presence of 1 mM selenite (▼).

Los geles teñidos con tinción azul de Coomassie se muestran en la Figura 4a. Estos resultados se usaron como control de la presencia de proteínas en las fracciones utilizadas. Los geles tratados con la solución del ensayo diaforasa se presentan en la Figura 4b y los resultados muestran la presencia de actividad oxidoreductasa en la fracción de citosol y en la fracción de membrana externa (ME) lo que se detectó por la presencia de bandas de color violeta donde hubo reacción positiva. El ensayo con metil viológeno se utilizó para determinar la reducción de selenito en el gel nativo. Los resultados presentados en la Figura 4c muestran que hubo reducción de selenito por la detección de una banda clara sobre el gel teñido de color azul. Los resultados muestran que la actividad reductora de selenito se encuentra en la fracción de citosol mientras que en las otras fracciones ensayadas (MC y ME) no se observó reacción positiva (datos no mostrados). La banda que dio una reacción positiva presentó un patrón de migración electroforética de 0,34. Además, estos resultados muestran que independientemente de la presencia de selenito en el medio de cultivo de donde se obtuvieron las fracciones, se observó la banda con actividad reductora, sugiriendo que se trata de una proteína constitutivamente. La fracción de citosol está compuesta por las proteínas del citoplasma y por las proteínas del periplasma, es por ello que se determinó qué componente de la fracción de citosol reduce selenito. Para ello se determinó la reducción de selenito de forma cualitativa utilizando las proteínas de periplasma y las proteínas de citoplasma. La Figura 5 se muestra que la fracción de proteínas extracelulares (A) y las proteínas del periplasma (C) no muestran la aparición de un precipitado rojo esperado de actividad selenito reductasa. Los resultados muestran que tanto en

TABLA 1. Balance de  $\text{Se}^0$  durante la reducción de selenito por *P. agglomerans* UC-32.

TABLE 1.  $\text{Se}^0$  balance during selenite reduction by *P. agglomerans* UC-32.

|   | 0 h                  | 24 h                 | 48 h                        |                      |                             |
|---|----------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
|   | $C_{0 \text{ mM}}$   | $C_{24 \text{ mM}}$  | $C_{24} - C_{0 \text{ mM}}$ | $C_{48 \text{ mM}}$  | $C_{48} - C_{0 \text{ mM}}$ |
| <b>Selenito</b>                         | 0,954<br>$\pm 0,018$ | 0,433<br>$\pm 0,009$ | -0,521                      | 0,033<br>$\pm 0,004$ | -0,921                      |
| <b><math>\text{Se}^0</math> formado</b> | 0,000<br>$\pm 0,009$ | 0,353<br>$\pm 0,116$ | 0,353                       | 0,671<br>$\pm 0,053$ | 0,671                       |

$C_0$ : Concentración inicial;  $C_{24}$ : Concentración a las 24 h;  $C_{48}$ : Concentración a las 48 h ( $\bar{x}$  de 3 determinaciones).  $C_0$ : initial concentration;  $C_{24}$ : concentration after 24 h;  $C_{48}$ : concentration after 48 h (average of 3 assays)

la fracción de proteínas intracelulares (B) específicamente en la fracción de proteínas del citoplasma (D) es posible observar la presencia de  $\text{Se}^0$ . Estos resultados sugieren que la fracción citoplasmática reduce selenito a  $\text{Se}^0$ .

En la Figura 6 se muestra el efecto del selenito sobre la expresión de proteínas, encontrándose que las fracciones obtenidas a partir de cultivos en presencia de selenito o en ausencia no muestran diferencias en el perfil de proteínas sugiriendo la participación de proteínas expresadas constitutivamente.

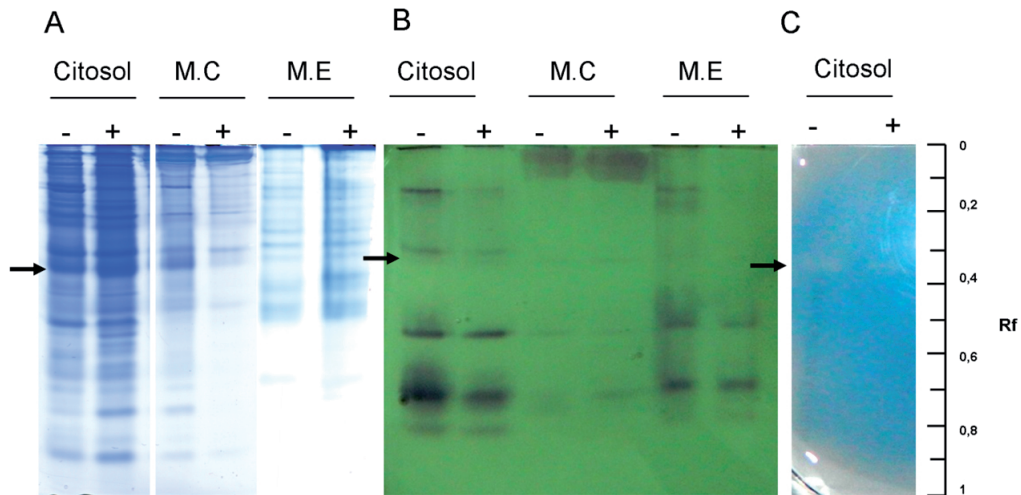


FIGURA 4. Zimograma de proteínas de las fracciones de citosol, membrana citoplasmática y membrana externa. Tinción con azul de Coomassie (A), ensayo diaforasa (B) y ensayo metil viológeno (C). Cultivos incubados sin selenito (-) y con selenito (+). La fracción que reduce selenito se indica con una flecha negra.

FIGURE 4. Zymography of proteins from cytosolic, plasma membrane and external membrane fractions. Coomassie blue staining (A), diaphorase assay (B) and methyl viologen assay (C). Cultures were incubated in the absence (-) or presence (+) of selenite. The fraction reducing selenite is indicated by the black arrow.

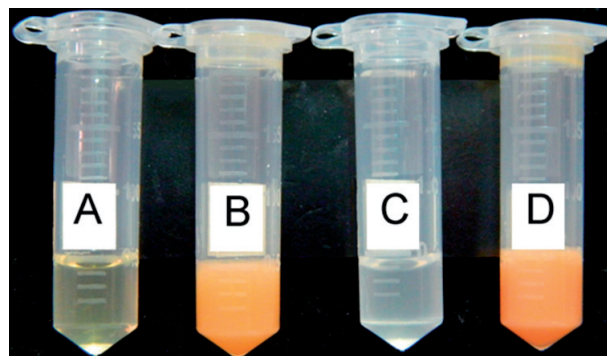


FIGURA 5. Reducción de selenito (1 mM) por diferentes fracciones de proteínas. Fracción de proteínas extracelulares (A), intracelulares (B), de periplasma (C) y de citoplasma (D).

FIGURE 5. Selenite (1 mM) reduction by different protein fractions. Extracellular proteins fraction (A), intracellular proteins fraction (B), periplasmic proteins fraction (C) and cytoplasm proteins fraction (D).

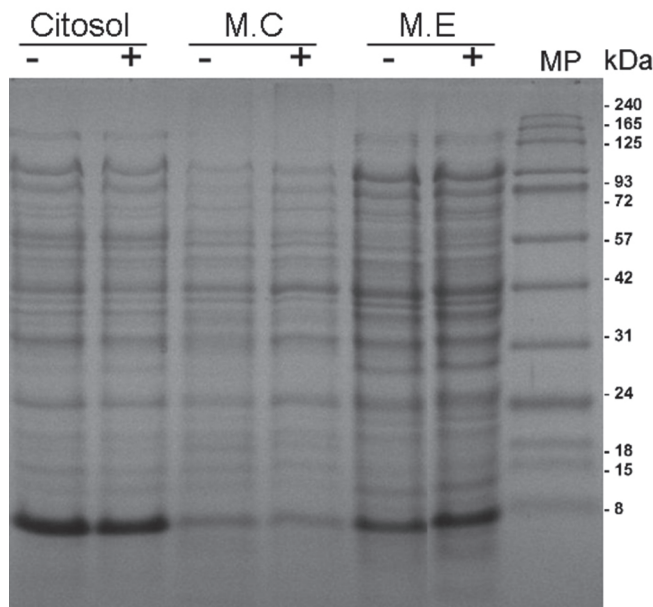


FIGURA 6. SDS-PAGE de las fracciones celulares de citosol, membrana citoplasmática y membrana externa de cultivos de *P. agglomerans*. Cultivos incubados sin selenito (-), con selenito (1 mM) (+). Marcador de peso molecular (MP).

FIGURE 6. SDS-PAGE of cytosolic, plasma membrane and external membrane fractions of *P. agglomerans* cultures. Cultures were incubated in the absence of selenite (-) or in the presence of 1 mM selenite (+). MP: molecular weight marker.

## DISCUSIÓN

La reducción de selenito a nanopartículas de  $\text{Se}^0$  se realiza a través de métodos químicos y biológicos, sin embargo, el uso de sustancias químicas es costoso y tiene efectos perjudiciales sobre el ambiente. Es así como el uso de microorganismos apunta hacia el desarrollo de una tecnología verde además de conferir propiedades diferenciadoras a las nanopartículas sintetizadas.

En trabajos previos de este laboratorio se demostró que *P. agglomerans* es capaz de crecer en presencia de selenito reduciendo el selenito a selenio elemental (Torres *et al.* 2012). En este trabajo, *P. agglomerans* cepa UC-32 fue cultivada en un medio que contenía selenito obteniéndose nanopartículas de  $\text{Se}^0$  lo que se comprobó por la presencia de un precipitado rojo en el medio de cultivo de acuerdo a lo reportado por Dwivedi *et al.* (2013).

Se han reportado diversas bacterias que reducen selenito (*Thauera selenatis*, *Bacillus selenitireducens* y *Escherichia coli*, entre otras) (Li *et al.* 2014), sin embargo *P. agglomerans* reduce selenito en condiciones aeróbicas lo que proporciona una ventaja en la obtención de nanopartículas de  $\text{Se}^0$ .

Los resultados indicaron que el selenio elemental se forma en el citoplasma de células de *P. agglomerans* crecida

en presencia de selenito, lo que se correspondió con resultados previos reportados por Li *et al.* (2014). Trabajos previos de Dhanjal & Cameotra (2010) también proponen que la biosíntesis de nanopartículas de  $\text{Se}^0$  involucra la participación de una enzima reductasa asociada a la membrana. Sin embargo, Belzile *et al.* (2006) son los únicos autores que han reportado que la reducción de selenito a selenio elemental ocurriría por acción de la fracción soluble, ya sea citoplasma o periplasma bacteriano, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo.

Kessi *et al.* (2004) investigaron el posible rol del sistema glutatión/glutatión reductasa en la formación de nanopartículas de  $\text{Se}^0$ . Para poder aclarar el mecanismo de reducción del selenito a selenio elemental por *P. agglomerans* UC-32 uno de los experimentos fue evaluar la electroforesis en condiciones nativas de las proteínas obtenidas por fraccionamiento celular lo que reveló la presencia de varias enzimas con actividad oxidoreductasa. En este trabajo se observó que las enzimas que están participando de la reducción de selenito, corresponden a aquellas que pertenecen a la fracción de proteínas del citoplasma a diferencia de lo publicado por Lampis *et al.* (2014), quienes reportan que la reducción de selenito ocurre en su mayoría en la fracción de proteínas asociadas a membrana. Estos autores además señalan que la reducción ocurriría después de la adición de NADH lo que tampoco se

corresponde con nuestros resultados puesto que al evaluar la reducción de selenito solo se observó reducción cuando se utilizó NADPH como cofactor y no cuando se utilizó NADH.

Hunter *et al.* (2007) reportaron que luego de realizar una electroforesis en geles nativos de un extracto libre de células de *Rhizobium* sp. cepa B1, se observó actividad enzimática selenito reductasa en dos bandas con un patrón de migración electroforético (Rf) de 0,32 y de 0,49, respectivamente. Ellos determinaron que la banda con un Rf de 0,32 corresponde con una banda que reducía NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Rf = 0,34), sugiriendo que una nitrito reductasa estaría participando de la reducción de selenito. Sin embargo, estos autores determinaron que al adicionar tungsteno la reducción disminuía en un 90% concluyendo que una proteína que contiene molibdeno, estaría involucrada en la reducción debido a que solo proteínas que contienen molibdeno son por acción del tungsteno. Las enzimas nitrito reductasa no pueden ser inhibidas por tungsteno puesto que solo se ha descrito que presentan Cu o Fe en su centro activo, descartando en este caso que la actividad reductora corresponda a este tipo de enzima. Nuestros resultados muestran al igual que Hunter *et al.* (2007) que la electroforesis nativa de la fracción de citoplasma presenta una banda con actividad selenito reductasa con un patrón de Rf de 0,34, por lo que sería necesario determinar el peso molecular y a qué proteína correspondería dicha banda.

Este microorganismo, sus enzimas o su DNA podrían servir en bioreactores diseñados para remover el selenito desde agua o suelos impactados y además se podría aprovechar el potencial biotecnológico del producto de la reducción de las nanopartículas de selenio.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto FONDEF CA12-I-10374 y a CONICYT-REGIONAL R08C1002 por el financiamiento recibido, y a Iris Carrasco por su colaboración en la preparación y caracterización de muestras.

### BIBLIOGRAFIA

- AVAZERI C., TURNER R.J., POMMIER J., WEINER J.H., GIORDANO G. Y VERMEGLIO A. 1997. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology-Uk* 143(4):1181-1189.
- BELZILE, N., CHEN, Y.W., GUNN, J.M., TONG, J., ALARIE, Y., DELONCHAMP, T. & LANG, C.Y. 2006. The effect of selenium on mercury assimilation by freshwater organisms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63(1):1-10.
- BISWAS, K.C., BARTON, L.L., TSUI, W.L., SHUMAN, K., GILLESPIE, J. & EZE, C.S. 2011. A novel method for the measurement of elemental selenium produced by bacterial reduction of selenite. *Journal of Microbiological Methods* 86(2):140-144.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- CHENG, K.L. 1956. Determination of traces of selenium 3,3-diaminobenzidine as selenium (IV) organic reagent. *Analytical Chemistry* 28(11):1738-1742.
- DHANJAL, S. & CAMEOTRA, S.S. 2010. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial Cell Factories* 9(1):1-11.
- DWIVEDI, S., ALKHEDHAIRY, A.A., AHAMED, M. & MUSARRAT, J. 2013. Biomimetic synthesis of selenium nanospheres by bacterial strain JS-11 and its role as a biosensor for nanotoxicity assessment: A novel Se-bioassay. *Plos One* 8(3):1-10.
- GAO, X., ZHANG, J. & ZHANG, L. 2002. Hollow Sphere Selenium Nanoparticles: Their In-Vitro Anti Hydroxyl Radical Effect. *Advanced Materials* 14(4):290-293.
- HUNTER, W. & KUYKENDALL, L.D. 2007. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Rhizobium* sp. strain B1. *Current Microbiology* 55(4):344-349.
- HUNTER, W. & MANTER, D. 2009. Reduction of selenite to elemental red selenium by *Pseudomonas* sp. strain CA5. *Current Microbiology* 58(5):493-498.
- HUNTER, W.J. 2014. *Pseudomonas seleniipraecipitans* proteins potentially involved in selenite reduction. *Current Microbiology* 69(1):69-74.
- JIANG, W. 1994. Delineating the distribution of selenium in bacterial cultures that reduce and methylate oxyanions of this toxic metalloid. Master of Science. Sam Houston State University, The Faculty of the Department of Chemistry.
- KESSI, J. 2006. Enzymic systems proposed to be involved in the dissimilatory reduction of selenite in the purple non-sulfur bacteria *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology-Uk* 152(3):731-743.
- KESSI, J. & HANSELMANN, K.W. 2004. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 279(49):50662-50669.
- KOJOURI, G.A., SADEGHIAN, S., MOHEBBI, A. & MOKHBER DEZFOULI, M.R. 2012. The Effects of Oral Consumption of Selenium Nanoparticles on Chemotactic and Respiratory Burst Activities of Neutrophils in Comparison with Sodium Selenite in Sheep. *Biological Trace Element Research* 146(2):160-166.
- LAMPIS, S., ZONARO, E., BERTOLINI, C., BERNARDI, P., BUTLER, C.S. & VALLINI, G. 2014. Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* SeITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. *Microbial Cell Factories* 13(35):1-14.
- LI, B., LIU, N., LI, Y., JING, W., FAN, J., LI, D., ZHANG, L., ZHANG, X., ZHANG, Z. & WANG, L. 2014. Reduction of selenite to red elemental selenium by *Rhodopseudomonas palustris*

- strain N. Plos One 9(4):1-10.
- LI, D.B., CHENG, Y.Y., WU, C., LI, W.W., LI, N., YANG, Z.C., TONG, Z.H. & YU, H.Q. 2014. Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. Scientific Reports 4(3735):1-7.
- SADEGHIAN, S., KOJOURI, G.A. & MOHEBBI, A. 2012. Nanoparticles of selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite. Biological Trace Element Research 146(3):302-308.
- SCHAGGER, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. Nat Protoc 1(1):16-22.
- SUN, H.J., RATHINASABAPATHI, B., WU, B., LUO, J., PU, L.P. & MA, L.Q. 2014. Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. Environment International 69(0):148-158.
- TORRES, S.K. 2012. Biosíntesis aeróbica y funcionalización de nanopartículas de selenio elemental. Tesis Magister en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas.
- THEIN, M., SAUER, G., PARAMASIVAM, N., GRIN, I. & LINKE, D. 2010. Efficient subfractionation of Gram-negative bacteria for proteomics studies. Journal of Proteome Research 9(12):6135-6147.
- TURAGOVA, A.V., VETCHINKINA, E.P., LOSHCININA, E.A., BUROV, A.M., NIKITINA, V.E. & KAMNEV, A.A. 2014. Reduction of selenite by *Azospirillum brasilense* with the formation of selenium nanoparticles. Microbial Ecology 68(3):495-503.
- ZHENG, S., SU, J., WANG, L., YAO, R., WANG, D., DENG, Y., WANG, R., WANG, G. & RENSING, C. 2014. Selenite reduction by the obligate aerobic bacterium *Comamonas testosteroni* S44 isolated from a metal-contaminated soil. BMC Microbiology 14(1):1-14.

Recibido: 01.06.15  
Aceptado: 15.03.16